

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes Berlin
Direktor: Prof.Dr.med.Hansjürgen Raettig

ORALE IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN MIT
IMPFSTOFFEN AUS PHYSIKALISCH INAKTI-
VIERTEN S.TYPHI MURIUM BAKTERIEN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bernd Kordes
aus Würzburg

1969

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes Berlin
Direktor: Prof.Dr.med.Hansjürgen Raettig

ORALE IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN MIT
IMPFSTOFFEN AUS PHYSIKALISCH INAKTI-
VIERTEN S.TYPHI MURIUM BAKTERIEN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bernd Kordes

aus Würzburg

Dekan: Prof.Dr.med. Hans Heinz N a u m a n n
Referent: Prof.Dr.med. Hansjürgen Raettig
Korreferent: Prof.Dr.med. Bernhard Schmidt



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17.April 1969

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	Seite
A. Einleitung	3
B. Material und Methoden	5
C. Ergebnisse	8
1. Bestrahlung mit UV Licht	8
a. HNS 12	8
b. HBO 500	9
2. Hitzeinaktivierung bei verschiedenen Temperaturen	13
D. Diskussion	20
1. Wirkungsweise der UV-Bestrahlung	20
2. Charakterisierung des Antigens	22
3. Unterschiedliche Dosiswirkung verschiedener Temperaturen	23
4. Versuch einer Deutung	23
E. Zusammenfassung	25
F. Literatur	26
Lebenslauf	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. EINLEITUNG

=====

Die orale Immunisierung gegen Typhus hat sich in zahlreichen Tier- und Feldversuchen bewährt (8, 13-16, 20). RAETTIG konnte nachweisen, daß sie einen weitgehend spezifischen Schutz erzeugt.

Wie auch bei parentralen Schutzimpfungen besteht bei der oralen Immunisierung das Problem, einen optimalen Impfstoff herzustellen. Neben der thermischen Inaktivierung, bei der in erster Linie eine Beeinflussung der Tertiär- und Quartärstrukturen des Proteins erfolgt, was z.B. zu einer Änderung der Löslichkeit führt, steht uns als weitere bewährte physikalische Methode der Inaktivierung die UV-Bestrahlung zur Verfügung. Bei ihr besteht die Möglichkeit, die Nukleinsäuren und das Protein aufgrund der verschiedenen Absorptionsspektren weitgehend getrennt zu beeinflussen. STEFFEN (18) gibt an, daß die Immunität an das Eiweiß und die Vermehrungsfähigkeit an die Nukleinsäure gebunden ist. Ein guter Totimpfstoff setzt also neben einem wenig geschädigten Protein eine Zerstörung der Replikationsfähigkeit der Nukleinsäure voraus. Bei welcher Inaktivierungsmethode das Protein in seiner immunogenen Eigenschaft möglichst weitgehend erhalten bleibt, sollte anhand von drei verschieden hergestellten Impfstoffen im Belastungsversuch geprüft werden. Folgende physikalische Inaktivierungsmethoden wurden für diese Versuche ausgewählt:

1. Die UV-Bestrahlung bei der Wellenlänge von 265 nm. Bei 265 nm, dem Absorptionsmaximum der Kernäquivalente, wird die DNS derart verändert, daß eine vollständige Reduplikation nicht mehr möglich ist (BEUKERS und BERENDS (2)).

2. Die UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 280 nm, die selektiv die Proteine schädigt. Zur Aufhebung der Vermehrungsfähigkeit ist jedoch eine größere UV-Dosis als zur Inaktivierung mit 254 nm nötig. Dieser Versuchsansatz sollte zeigen, daß nur ein weitgehend intaktes Protein immunisieren kann.
3. Die thermische Inaktivierung, bei der es mehr oder weniger zur Denaturierung des Eiweißes kommt. KINNE (9) kommt durch ihre Versuche, in denen sie Lebendimpfstoff mit hitzeinaktiviertem vergleicht, zu dem Ergebnis, daß hitzeinaktivierte Bakterien (60° C / 75 min) einen geringeren Schutz bewirken. Es sollte nun geprüft werden, ob höhere Temperaturen unterschiedliche Dosiswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit und die Immunogenität haben.

B. MATERIAL UND METHODEN

=====

Die benutzten Impfstoffe für die Versuche wurden folgendermaßen hergestellt:

1. Herstellung der Bakteriensuspension:

Stamm: *S. typhi* murium 6656 und 6616 wurden auf Agarplatten mit intermittierenden Mäusepassagen im Kühlschrank gehalten.

Die Anzüchtung fand in Vollbouillon 24 Std. bei 37°C statt,

die Reinigung über Bakterienfilter oder mit der Zentrifuge zweimal eine Stunde bei 4 000 U mit physiologischer Kochsalzlösung.

Die Einstellung auf 10^9 Keime pro ml wurde optisch oder durch Plattieren und Auszählen vorgenommen.

Die Bakteriensuspensionen wurden jeden Tag neu hergestellt.

2. Inaktivierung:

1. UV-Bestrahlung:

Bestrahlt wurden 10 ml in einem rotierenden Quarzrohr von 24 cm Länge und 1,5 cm Durchmesser, daraus ergab sich eine Schichtdicke von 0,09 cm.

Die Kühlung bestand aus einem Ventilator.

Als Strahlungsquellen wurden 2 HNS 12 Lampen mit einer Wellenlänge von vorwiegend 254 nm und eine HBO 500 Lampe (Osram) mit einem WG 7 Filter (Schott u.Gen) mit einer Wellenlänge vorwiegend größer 280 nm benutzt.

2. Hitzeinaktivierung:

Stamm 6656 wurde in Glasröhrchen, die 200 mm Länge und 5 mm Durchmesser hatten, mit 2,0 ml Suspension,

die 10^0 Keime pro ml enthielt, gefüllt und in Wasserbädern von 60°C , 70°C , 80°C , 90°C und 100°C (Höppler-Thermostat) inaktiviert und unmittelbar danach in Eiswasser abgekühlt.

Inaktivierungszeiten:

60°C	/ 70 min
70°C	/ 55 min
80°C	/ 25 min
90°C	/ 10 min
100°C	/ 3 min.

Diese Zeiten ergaben eine Inaktivierung auf weniger als 1 Keim pro ml.

3. Sterilitätskontrolle:

0,5 ml Suspension wurde in 4,5 ml Bouillon und 0,3 ml Suspension auf Agarplatten pipettiert.

4. Aufbewahrung des Impfstoffes:

Die UV inaktivierten Bakteriensuspensionen wurden tiefgefroren (-25°C), eine Woche gesammelt und gefrieretrocknet. Bei Gebrauch wurden sie mit aqua bidest. aufgelöst.

5. Versuchstiere:

Alle Versuche wurden mit weißen NMRI (Naval Medical Res.Inst.) Mäusen aus der Zucht des RKI durchgeführt. Das Gewicht lag bei 12 - 14 g, gehalten wurden sie in Gruppen zu 25 Tieren beiderlei Geschlechts in Plastikkästen und mit Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser ernährt.

6. Immunisierung:

Bei allen drei Versuchsanordnungen erhielten je 50 Tiere, die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden, an 2 x 5 Tagen 0,25 ml des Impfstoffes oral mit einer stumpfen Metallsonde zugeführt. Sichtbare Verletzungen kamen nicht vor. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt.

7. Infektion:

Infektionsmaterial: Stamm: 6656, 6616, 6639, 6643, 6659 (*S.typhi murium*), wurden 6 Stunden bei 37°C in Vollbouillon bebrütet. Die Tiere erhielten 10 Tage nach der letzten Immunisierung oral 0,2 ml dieser Bouillon (ca. 10^8 K/ml). Die Versuche wurden am 25.Tag nach der Infektion abgebrochen, da zu diesem Zeitpunkt nur noch vereinzelt Tiere starben.

C. ERGEBNISSE

1. UV-Bestrahlung

Die Inaktivierung auf weniger als einen Keim pro ml durch die UV - Bestrahlung bei geringster Schädigung der Zelle setzte voraus, daß die kürzeste Bestrahlungszeit gefunden werden mußte, die dieser Anforderung entsprach. Die Prüfung erfolgte durch Auspipettieren auf Agarplatten und in Bouillon, wobei eine infektiöse Einheit pro 2,0 ml zugelassen wurde. Die optimale Ausleuchtung des Quarzrohres wurde bei einem Abstand von 4,0 cm erreicht, da die HNS Lampen gestreckte Strahler sind. Variiert wurde die Menge der Bakteriensuspension im Quarzrohr, und damit auch die Schichtdicke und die Bestrahlungsdauer. Daraus ergab sich eine Bestrahlungszeit von 30 min bei einer Bakterienmenge von 10 ml. Für die HBO 500 wurde eine Zeit von 150 min ermittelt bei gleicher Suspensionsmenge. Hier mußte der Abstand aber auf 16 cm erhöht werden, da bei dem punktförmigen Strahler sonst keine vollständige Ausleuchtung erreicht worden wäre. Der Impfstoff wurde gefriergetrocknet und im Kühlschrank gelagert. Bei der Auflösung nach einem Jahr traten keine Reaktivierungserscheinungen auf. Beide Impfstoffe wurden 10 mal oral mit der Metallsonde verfüttert und das Absinken der Mortalität nach oraler Belastungsinfektion gegenüber der Kontrolle als Kriterium der Schutzwirkung herangezogen. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I und II angegeben.

Die Endmortalität der mit dem HNS Impfstoff immunisierten Tiere konnte von 59,1 % auf 33,8 % gesenkt werden, also fast um die Hälfte. Die beobachtete Differenz $Db = 25,3 \%$ übersteigt die größte zulässige Zufallsdifferenz $Dz = 18,0 \%$ um das 1,4 fache (Tab.V). Der

Wirkungsindex beträgt 42,8.

Abbildung 1 zeigt die Summenkurven der Mortalität der geimpften Tiere gegenüber den Kontrollen. Der Impf-
folg zeigt sich in der Vergrößerung der Überlebens -
chance und in der Verringerung der Endmortalität, die
aus der Differenz beider Kurven zu erkennen ist.

Aus der Tabelle II geht hervor, daß die Endmortalität
der mit dem HBO 500 Impfstoff immunisierten Tiere mit
30,0 % gegenüber den Kontrollen mit 37,0 % nur um 7 %
gesenkt werden konnte. Die größte zulässige Zufalls -
differenz liegt aber bei $Dz = 17 \%$ (Tab. V), sodaß
das Ergebnis innerhalb der statistischen Streuung liegt
und daher nicht zu verwerten ist.

Die Summenkurven in Abbildung 2 zeigen, daß die Morta-
lität der geimpften Tiere bis zum 12.Tag höher liegt,
als die der Kontrollen und erst danach eine Differenz
der geimpften von den ungeimpften Tieren zu erkennen
ist. Der Grund für die anfänglich höhere Mortalität
konnte nicht geklärt werden.

Versuch	Immunisierte Tiere			Kontrolle			W.I.
	n	+	%	n	+	%	
1	49	15	30,6	50	26	52,0	41,1
2	40	11	27,5	38	24	63,1	72,2
10	50	21	42,0	50	32	64,0	34,4
Summe	139	47	33,8	138	82	59,1	42,8

Tabelle I: Orale Immunisierung mit dem HNS 12 Impfstoff. Infektion: oral

Versuch	Immunisierte Tiere			Kontrolle			W.I.
	n	+	%	n	+	%	
3	50	8	16	50	8	16	0
4	50	17	34	50	24	48	29,1
9	50	20	40	50	23	46	13,0
Summe	150	45	30,0	150	55	37,0	19,0

Tabelle II: Orale Immunisierung mit dem HBO 500 Impfstoff. Infektion: oral

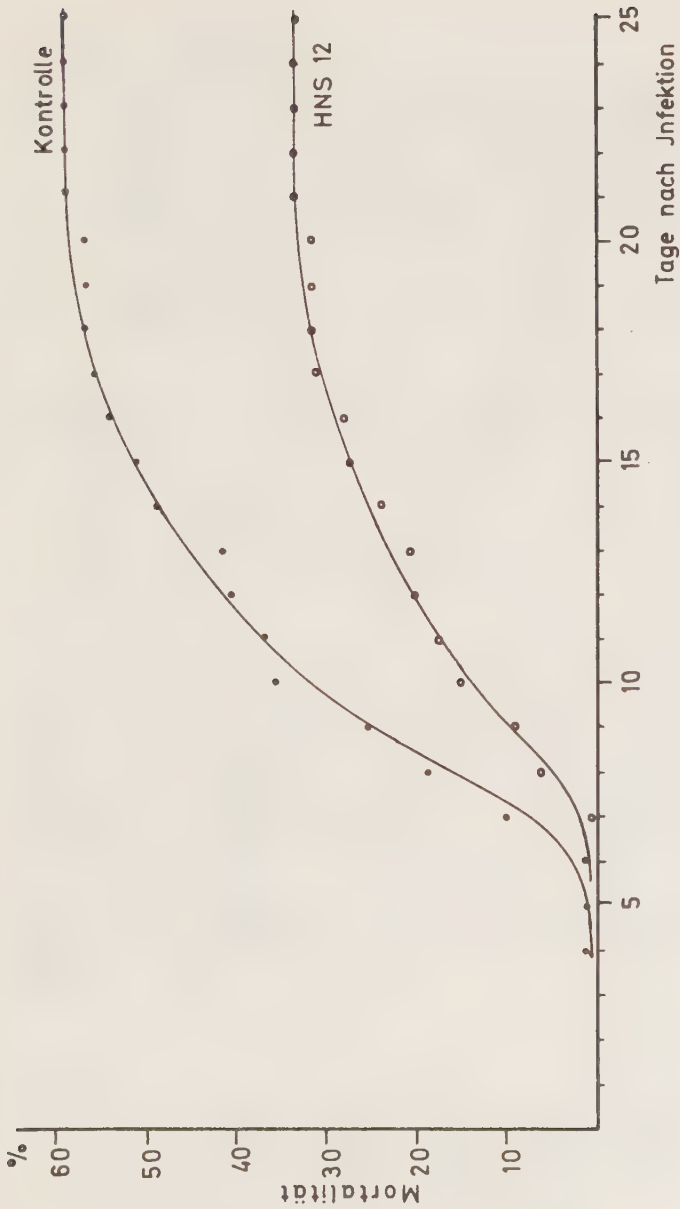


Abb.1: Orale Immunisierung mit dem HNS 12 Impfstoff.
Infektion: oral
(3 Versuche mit 277 Mäusen)

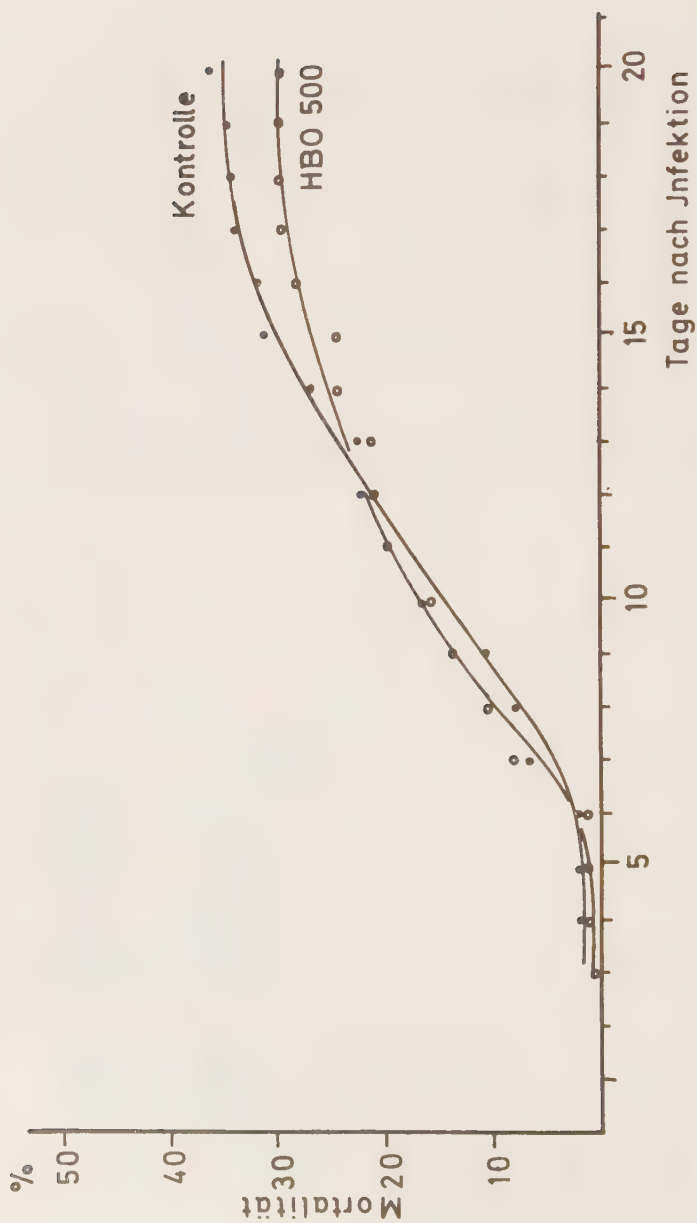


Abb. 2: Orale Immunisierung mit dem HBO-500 Impfstoff.
Infektion: oral
(3 Versuche mit 300 Mäusen)

2. Hitzeinaktivierung

In Tabelle III sind die Ergebnisse dieses Versuches angegeben. Die Mäuse wurden oral immunisiert mit Impfstoffen, die wie oben beschrieben hergestellt worden sind. Als Kriterium des Schutzes wurde wiederum die Mortalität nach oraler Belastungsinfektion bei vorhergehender Immunisierung herangezogen. Die beobachtete Differenz Db und die dazugehörige zulässige Zufallsdifferenz Dz und der Echtheitswert sind aus Tabelle V zu entnehmen.

Aus Tabelle III geht hervor, daß der Immunisierungs - schutz innerhalb der Versuchsansätze verhältnismäßig großen Schwankungen unterliegt. Die einzige Ausnahme macht die Gruppe 5 ($100^{\circ}\text{C}/3 \text{ min}$), bei der die Ergebnisse gut zu reproduzieren waren. Auf diese Erscheinung soll später noch eingegangen werden.

Die Ergebnisse, bei denen Mäuse mit Impfstoffen $100^{\circ}\text{C}/5 \text{ min}$ und $100^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$ immunisiert wurden, sind aus Tabelle IV ersichtlich. Die erste Gruppe dieser Tabelle ist zum Vergleich vom vorhergehenden Versuchsansatz übernommen worden. Die Mortalität der geimpften Tiere konnte gegenüber den Kontrollen bei beiden Versuchen um die Hälfte gesenkt werden. Die beobachtete Differenz Db mit 32 % und die Db mit 17 % übersteigt die zulässige Zufallsdifferenz um das 1,5 fache bzw. um das 1,8 fache.

Impfstoff		1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch	Summe
60°C/ 70 min	n	24	50	50	50	174
	+	13	24	15	29	81
	%	54,2	48,0	30,0	58,0	46,6
	W. I.	26,1	29,4	59,5	32,6	28,3
=====						
70°C/ 55 min	n	28	50	50	50	178
	+	10	23	19	31	83
	%	35,8	46,0	38,0	62,0	46,6
	W. I.	37,5	32,4	48,6	27,9	38,3
=====						
80°C/ 15 min	n	29	49	50	50	178
	+	7	12	20	20	59
	%	24,1	24,5	40,0	40,0	33,1
	W. I.	67,1	64,0	45,9	53,5	56,2
=====						
90°C/ 10 min	n	26	50	50	50	176
	+	5	8	12	20	45
	%	19,3	16,0	24,0	40,0	25,3
	W. I.	73,6	76,5	67,6	53,5	66,5
=====						
100°C/ 3 min	n	27	50	50	50	177
	+	6	9	11	13	39
	%	22,3	18,0	22,0	26,0	22,0
	W. I.	69,6	73,5	70,3	69,8	70,1
=====						
Kon- trolle	n	30	50	50	50	180
	+	22	34	37	43	136
	%	73,3	68,0	74,0	86,0	75,6

Tabelle III: Orale Immunisierung mit Impfstoffen, die bei verschiedenen Temperaturen hergestellt wurden.
Infektion: oral



Abb.3: Orale Immunisierung mit Impfstoffen, die durch Hitzeinaktivierung von *S. typhimurium* Bakterien hergestellt wurden.
Infektion: oral
(4 Versuche mit 1063 Mäusen)

Impfstoff	Ver- such	Immunisierte Tiere			Kontrolle			W.I.
		n	+	%	n	+	%	
100°C/ 3 min	5	27	6	22,3	30	22	73,3	69,6
	6	50	9	18,0	50	34	68,0	73,5
	7	50	11	22,0	50	37	74,0	70,3
	8	50	13	26,0	50	43	86,0	69,8
	Summe	177	39	22,0	180	136	75,6	70,1
=====								
100°C/ 5 min	9	50	9	18,0	50	26	52,0	65,4
	10	50	17	34,0	50	32	64,0	46,9
	Summe	100	26	26,0	100	58	58,0	55,0
=====								
100°C/ 10 min	1	50	17	34,0	50	26	52,0	39,6
	2	35	9	25,7	38	24	63,1	59,4
	3	50	14	28,0	50	25	50,0	44,0
	4	50	11	22,0	50	28	56,0	60,7
	Summe	185	51	27,6	188	103	54,7	50,0
=====								

Tabelle IV: Orale Immunisierung mit Impfstoffen, die bei 100°C, aber verschiedenen Inaktivierungszeiten hergestellt wurden.
Infektion: oral

Der Wirkungsindex liegt bei 55,0 bzw. bei 50,0.

Aus der Abbildung 4, bei der die dazugehörigen Kontrollen gleich 100 % gesetzt worden sind, erkennt man den abnehmenden Immunisierungsschutz nach längerer Erhitzung an der geringeren Differenz der Kurven.

Die Tabelle V zeigt eine Übersicht über die Versuchsergebnisse. In den letzten beiden Spalten sind die zulässige Zufallsdifferenz und der dazugehörige Echtheitswert aufgetragen.

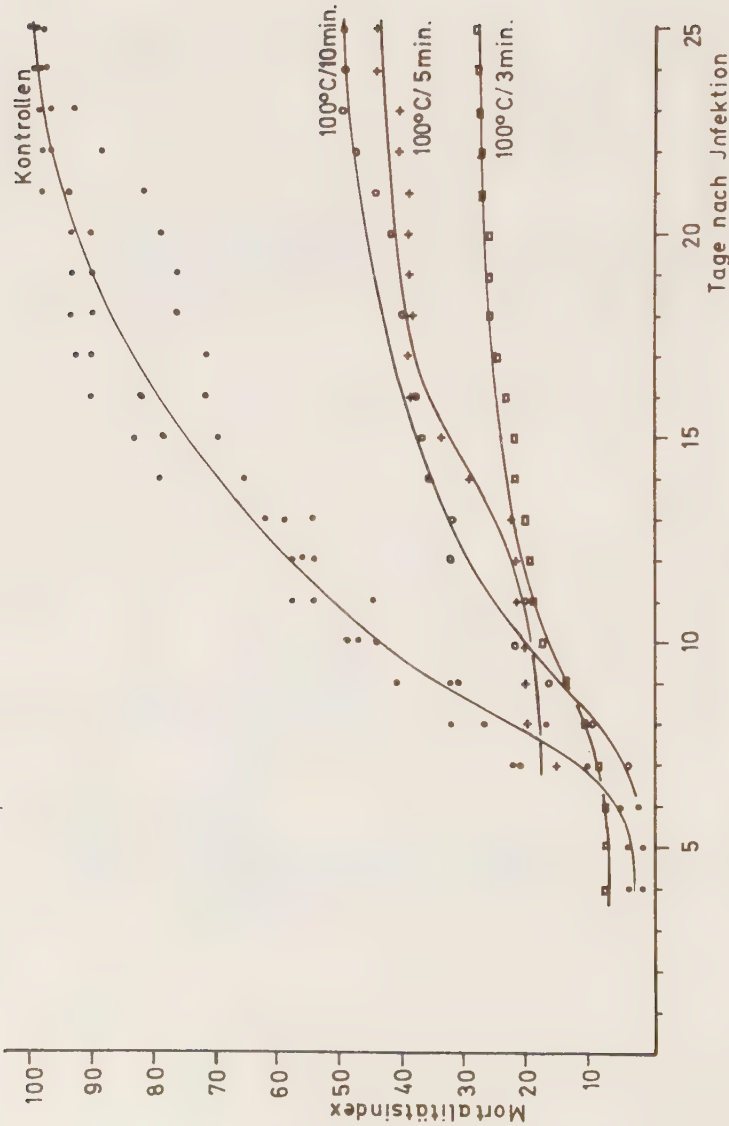


Abb. 4: Orale Immunisierung mit hitzeinaktivierten
S. typhimurium Bakterien.
 Infektion: oral
 (10 Versuche mit 930 Mäusen)

Impfstoffe	Zahl d. Ver- suche	Immunis. Tiere		Kontrolle		W. I.	D _b	D _Z	E
		n	+	n	+				
HNS 12	3	139	47	138	82	42,8	25,3	18,0	1,40
HBO 500	3	150	45	150	55	19,0	7,0	17,0	0,41
60°C/70 min	4	174	81	180	136	28,3	29,0	16,0	1,81
70°C/55 min	4	178	83	180	136	38,3	29,0	16,0	1,81
80°C/15 min	4	178	59	180	136	56,2	42,5	16,0	2,66
90°C/10 min	4	176	45	180	136	66,5	50,3	15,0	3,36
100°C/ 3 min	4	177	39	180	136	70,1	53,6	14,5	3,70
100°C/ 5 min	2	100	26	100	58	55,0	32,0	21,0	1,53
100°C/10 min	4	185	51	188	103	50,0	27,1	15,0	1,81

Tabelle V: Übersicht über die Versuchsergebnisse mit verschiedenen, auf physikalischem Wege hergestellten, Impfstoffen.
Infektion: oral

D. DISKUSSION

=====

Die Voraussetzung zur Charakterisierung der Antigenität von Bakterien nach verschiedenen physikalischen Inaktivierungsmethoden war, daß die Bestrahlung mit der HNS 12, bei der die ausgestrahlte Energie im wesentlichen eine Wellenlänge von 254 nm hat, vornehmlich in der DNS absorbiert wird und dort Veränderungen hervorruft, während die Bestrahlung mit der HBO+WG 7 Veränderungen im Protein bewirkt. BEUKERS und BERENDS (1,2) konnten nachweisen, daß die photochemische Wirkung des UV in der DNS hauptsächlich eine Dimerisierung des Thymins bewirkt. Die Inaktivierungskurven durch UV bei Bakterien und Phagen weisen auf einen Eintreffervorgang hin, was auch für die Dimerisierung des Thymins gilt (TIMOFEEF-RESSOVSKY u. ZIMMER (19) und JACHERTS u. JACHERTS (7)). HANAWALT u. SETLOW (6) wiesen jedoch nach, daß nach Absorption von UV Strahlen der Wellenlänge 265 nm eine Einbauhemmung von radioaktiv markierten S^{35} in Protein und P^{32} in die RNS stattfindet. Mc. LAREN u. LUSE (11) beobachteten Zerstörungen des Tryptophanringes im Chymotrypsin und Sprengungen der Disulfidbrücken im Trypsin und in der Ribonuklease. Diese Ergebnisse lassen keine ausschließliche Einwirkung der Strahlung von 265 nm auf die DNS erwarten, was ebenfalls für 254 nm gelten sollte. HANAWALT u. SETLOW (6) zeigten aber, daß die Proteinschädigung einen Schwellenwert aufweist (Mehrtrefferprozeß), während die DNS-Schädigung schon bei geringster Bestrahlungsdosis einsetzt (Eintrefferprozeß), sodaß auch aus diesem Grunde die Einwirkung auf das Protein bei Bestrahlung mit UV von der Wellenlänge 265 nm im Hinblick auf die Vermehrungsfähigkeit zweitrangig ist. Die Kombination der HBO und des UV Filters WG 7 läßt eine Bestrahlung im Wel-

lenbereich von 280 - 360 nm zu. Da das Absorptionsmaximum des Proteins bei 280 nm liegt, kann bei einer solchen Bestrahlung eine bevorzugte Schädigung des Proteins vorausgesetzt werden. Als Kriterium der Inaktivierung wurde der Verlust der Vermehrungsfähigkeit herangezogen.

Die Bestrahlungsdauer mit der HNS 12 konnte auf 30 min begrenzt werden, so daß größere Veränderungen im Protein nicht zu erwarten waren. Die Bestrahlungszeit mit der HBO 500 betrug dagegen 150 min. Der Grund für die relativ lange UV-Einwirkung liegt sehr wahrscheinlich in einer wesentlich geringeren Empfindlichkeit der Vermehrungsfähigkeit gegenüber Proteinschäden im Vergleich zu DNS Schäden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß der Verlust der Vermehrungsfähigkeit durch Bestrahlung mit 280 nm auch auf DNS Schäden zurückzuführen ist, was jedoch für die Fragestellung ohne Belang ist.

Die Bestrahlungsdauer der Bakterien mit UV der Wellenlänge 254 nm (HNS 12) sollte bei weitgehendem Verlust der Vermehrungsfähigkeit das Eiweiß möglichst ungeschädigt lassen. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, einen gut wirksamen Impfstoff zu erhalten, was die Annahme unterstützen würde, daß der immunogen wirksame Anteil der Bakterien das Protein ist.

Eine weitere Bestätigung für diese Annahme sollte die Bestrahlung mit der HBO 500 bei einer Wellenlänge von 280 nm bis 360 nm sein. Die photochemischen Wirkungen auf das Eiweiß sind so vielfältig, daß es nicht ohne weiteres möglich ist, zu entscheiden, welche Veränderungen im Protein der Bakterien bei dieser Bestrahlungsart hervorgerufen werden (Zusammenstellung der Untersuchun-

gen z.B. bei GIESE (5) und Mc.LAREN (10)). Allgemein kann aber als Folge dieser Bestrahlung eine Denaturierung des Bakterieneiweißes angenommen werden, die zu einer leichteren Spaltung im Darm der immunisierten Tiere und einer besseren Resorption führt (GIESE) (5). Es ist aber als weitere Folge ein teilweiser Verlust der Spezifität zu vermuten, was die Brauchbarkeit so inaktivierter Bakterien als Impfstoff herabsetzen würde. Die Versuchsergebnisse konnten in weiten Grenzen die Annahme der immunogenen Wirksamkeit des Proteinteils der Bakterien bestätigen. Der Impfstoff, hergestellt durch Bakterienbestrahlung mit der HNS 12, erreichte einen Wirkungsindex von 42,8, der mit der HBO 500 hergestellte Impfstoff nur von 19. Die Summenkurven in Abbildung 1 zeigen den typischen Verlauf für eine zyklisch ablaufende Infektion. Die Mortalitätskurve für die Kontrollen steigt zwischen dem 6. und 10.Tag steil an und zeigt nach dem 14.Tag noch einmal eine verstärkte Zunahme der Mortalität. Die Kurve der immunisierten Tiere verläuft dagegen weniger steil und nähert sich nach dem 17.Tag dem Wert für die Endmortalität. Die Kurven in Abbildung 2 verlaufen dagegen vollkommen anders. Beide Summenkurven zeigen einen etwa gleichstarken wenig steilen Anstieg, wobei die Kurve der immunisierten Tiere bis zum 12.Tag über der der Kontrollen liegt und trennen sich erst danach. Der wenig steile Anstieg wäre auf eine geringere Virulenz des Infektionskeimes zurückzuführen, zumal die Endmortalität der Kontrollen mit 37 % niedriger liegt, als im vorhergehenden Versuchsan-satz.

Den Versuch, Impfstoffe durch Inaktivierung von Bakterien bei verschiedenen Temperaturen herzustellen, lag folgende Überlegung zugrunde: Wenn es richtig ist, daß eine Erhitzung der Bakterien bei niedriger Temperatur

aber langer Einwirkungszeit einen besseren Impfstoff ergibt als ein kurzer aber heftiger Eingriff in die Bakterienstruktur bei hoher Temperatur, so sollte sich dieses Verhalten in einem entsprechenden Belastungsversuch auch bei oraler Immunisierung zeigen. SCHÜTZE (17) erhitzte S.aertrycke auf 100°C 15 min und fand keine Zerstörung der Antigenität, dagegen zerstörte eine Erhitzung über 2 Stunden diese vollständig. ZINSSER (21) kochte Pferdeserum 40 min lang und konnte mit dem Filtrat antikörperhaltiges Kaninchenserum präzipitieren. Er erklärt diesen Befund durch eine nicht vollständige Denaturierung gewisser Proteine. Nach anschließender Alkoholbehandlung des Filtrates ist keine Präzipitation mehr nachweisbar, was auf das Vorhandensein intakter präzipitierender Antikörper im gekochten Pferdeserum hinweist.

In Vorversuchen habe ich die minimalen Inaktivierungszeiten für die verschiedenen Temperaturen bestimmt, die mit steigender Temperatur abnehmen. Das sagt aber noch nichts über die biologische Wertigkeit aus. Die Schutzversuche zeigten aber, daß der Impfstoff, der bei 100°C /3 min hergestellt wurde, die beste Schutzwirkung hatte.

Bei den bisher durchgeführten Schutzversuchen wurde immer eine erheblich größere Schwankung in den Ergebnissen festgestellt, die durch äußere Einwirkungen (z.B. interkurrente Krankheiten) nicht erklärt werden konnte. Eine Erklärung dafür könnte in der Aufbereitung des Impfstoffes zu suchen sein. Unter Umständen kommt es bei der kurzen, aber heftigen Erhitzung zur Freisetzung von Inhaltstoffen aus den Bakterien, die wegen der kurzen Einwirkungszeit der Temperatur wenig verändert werden und dadurch eine gute Immunisierung hervorrufen. Eine längere Erhitzung bewirkt eine zusätzliche Schädigung.

gung und damit einen geringeren Immunisierungsschutz, was aus den Versuchen, die in Abbildung 4 dargestellt sind, hervorgeht. BUXTON u. TORREY (3) erhitzten Ty - phusagglutino-gen eine halbe Stunde auf 72°C und spalteten es in einen festen und einen löslichen Anteil. Das Filtrat ruft Bildung von Antikörpern hervor, die auf Bakterienzellen agglutinierend wirken. Die Verfasser erklären dieses Phänomen durch Austreten von Plasmainhalt aus den Bakterien.

Eine andere Deutungsmöglichkeit ist durch die Annahme gegeben, daß die kurze Einwirkungszeit nicht ausreicht, das immuno-gen wirksame Eiweiß weitgehend zu denaturieren. Bei der Hitzedenaturierung tritt nicht nur eine Verringerung der Wasserlöslichkeit des Proteins ein, sondern es kommt zu Veränderungen in der Konformation, wobei Bindungen, welche die Peptidketten in ihrer Struktur festhalten, gebrochen werden. Sie liegen dann teilweise in irregulärer Anordnung vor. Bei diesem Vorgang werden jene Konfigurationen, die für die Spezifität des nativen Proteins verantwortlich sind, zerstört (STEFFEN) (18). Natives, nicht denaturiertes Eiweiß wird von den proteolytischen Enzymen wenig angegriffen und in größeren Molekülen von der Darmwand resorbiert (FLASCHENTRÄGER) (4). Es wäre daher durchaus möglich, daß die bessere Immunisierung auf resorbiertem, nicht denaturiertem Eiweiß beruht. Die geringere Schutzwirkung der Impfstoffe, hergestellt bei 100°C/5 min und 10 min gegenüber 100°C/3 min würde dann auf eine steigende Denaturierung mit steigender Einwirkungszeit zurückzuführen sein. Voraussetzung für diese Annahme wäre aber, daß das hitzestabile Endotoxin allein keine optimale Immunisierung hervorrufen kann. Versuche, die in Polen durchgeführt worden sind, scheinen dies zu bestätigen (12). Eine Aufklärung dieser Probleme wäre weiteren Versuchen vorbehalten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

=====

In der vorliegenden Arbeit wurden 9 Impfstoffe, die durch physikalische Inaktivierung von Bakterien hergestellt wurden, nach oraler Immunisierung im oralen Belastungsversuch geprüft. Die Inaktivierungsmittel bestanden aus UV-Bestrahlung von verschiedenen Wellenlängen und Hitzeinaktivierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten. Eine unterschiedliche Wirksamkeit der Impfstoffe konnte aufgrund der Tierversuche festgestellt werden. Den besten Schutz ergab der bei $100^{\circ}\text{C}/3$ min hergestellte Impfstoff, es folgten die bei $90^{\circ}\text{C}/10$ min, $80^{\circ}\text{C}/5$ min, $100^{\circ}\text{C}/5$ min und $100^{\circ}\text{C}/10$ min hergestellten Impfstoffe, dann der HNS 12 Impfstoff und die bei $70^{\circ}\text{C}/55$ min und bei $60^{\circ}\text{C}/70$ min hergestellten Impfstoffe und zuletzt der mit der HBO 500 Lampe hergestellte Impfstoff. Die unterschiedlichen Ergebnisse werden diskutiert.

F. LITERATUR

=====

1. BEUKERS,R.; W.BERENDS
Isolation and Identification of the irradiation
product of Thymine
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 41, 550-551 (1963)
2. The effects of UV irradiation on nucleic acids
and their components
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 49, 181-189 (1961)
3. BUXTON,B.H.; J.C.TORREY
J.med.Res. 14, 551 (1963)
(Handb.path.Mikroorg. III.Aufl. II,1,24 (1929))
Fischer,Urbau und Schwarzenberg
4. FLASCHENTRÄGER,B.
Physiologische Chemie
II/1a Springer Verlag (1954)
5. GIESE,A.C.
Action of ultraviolet Radiation on protoplasm
Physiol.Rev. 30, 431-459 (1950)
6. HANAWALT,P. und R.SETLOW
Effect of monochromatic ultraviolet light on
macromolecular synthesis in Escherichia coli
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 41, 283-294 (1964)
7. JACHERTS,D. und B.JACHERTS
Elemente der Bakterienphysiologie
Akad.Verlagsges.Frankfurt/M. (1964)
8. JANDL,G.
Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der
oralen Typhusimmunisierung
Z.Hyg.Infekt.-Kr. 151, 34-44 (1965)

9. KINNE, E.
Tierversuche zur oralen Impfung gegen menschen-
pathogene, Enteritis erregende Salmonellen
Diss. 1937 Berlin
10. McLAREN, A. D.
Photochemistry of enzymes, proteins and viruses
Advanc. in Enzymol. 9, 75-170 (1949)
11. McLAREN, A. D.; R. A. LUSE
Mechanism of inactivation of enzyme proteins by
ultraviolet light
Science 134, 836 (1961)
12. Polish Typhoid Committee
Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory
and in a controlled field trial in Poland
Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 15-27 (1965)
13. RAETTIG, H.
Tierexperiment zur oralen Immunisierung mit inak-
tiviertem Antigen
Zbl. Bakt. I. Orig. 182, 525-528 (1961)
14. Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen
gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Para-
typhus, Cholera, Ruhr)
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 183, 1-54 (1962)
15. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen
Mikroorganismen und ihren Antigenen. 1. Mitt.:
Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen
eine Enteritis-Infektion
Zbl. Bakt. I. Orig. 193, 398-410 (1964)
16. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen
Mikroorganismen und ihren Antigenen. 2. Mitt.:
Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei
der Enteritis-Infektion der Maus
Zbl. Bakt. I. Orig. 197, 368-388 (1965)

17. SCHÜTZE, H.

The importance of somatic antigen in the production of Aertrycke and Gärtner immunity in mice

Brit.J.exp.Path. 11, 34-42 (1930)

18. STEFFEN, C.

Allgemeine und Experimentelle Immunologie und Immunpathologie

Thieme Verlag Stuttgart 1968

19. TIMOFEEFF-RESSOVSKY, N.M. und K. ZIMMER

Das Trefferprinzip in der Biologie

Leipzig 1947

20. VLADOIANU, I.R.; G. DIMACHE; S. ANTONI; C. VLADOIANU; O. ZARMA

Laboratory tests on the effectiveness of oral vaccination of young children against typhoid and paratyphoid A and B

Bull.Wld.Hlth.Org. 32, 37-45 (1965)

21. ZINSSER, H.

On antigenic properties of horse serum and egg albumen after heat coagulation

J.Immunol. 9, 227-230 (1924)

Ich danke Herrn Prof.Dr.RAETTIG für die
Themenstellung.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr.PICHL
verpflichtet für die zahlreichen Diskussio-
nen und die Hilfe bei der Durchführung der
Arbeit.

Frau Ganze danke ich für die Assistenz bei
den Tierversuchen und der Herstellung der
Impfstoffe.

LEBENS LAUF

=====

Am 7.1.1942 wurde ich als Sohn des Dr.Oswald Kordes und seiner Ehefrau Regina Kordes in Würzburg geboren. Nach sechsjähriger Grundschulzeit besuchte ich sieben Jahre das Kant-Gymnasium und legte dort 1961 die Reifeprüfung ab. Zum Sommersemester 1961 wurde ich an der Freien Universität Berlin immatrikuliert und belegte als Hauptfach Humanmedizin. 1962 bestand ich dort das Vorphysikum, 1964 das Physikum und 1967 das Staatsexamen.

In meiner Medizinalassistentenzeit arbeitete ich sechs einhalb Monate auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses Spandau, darauf folgten sechs Monate Hygiene im Robert Koch-Institut und vier Monate Anästhesie im Krankenhaus Westend.

